

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-257895

(43)Date of publication of application : 29.09.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
 A62D 3/00  
 B09C 1/10  
 C02F 3/34  
 C07H 21/04  
 C12N 1/21  
 // C12N 9/02  
 (C12N 15/09  
 C12R 1:38 )  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )  
 (C12N 9/02  
 C12R 1:19 )

(21)Application number : 09-084401

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 18.03.1997

(72)Inventor : OMORI TOSHIO  
 TAKAMI KAZUTAKA

(54) OXIDASE GENE ORIGINATING FROM MICROORGANISM AND REMOVAL OF DIOXIN WITH THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new oxidase gene comprising a microorganism-originating oxidase gene capable of converting heteropolycyclic aromatic hydrocarbons into benzoic acid analogues and used for making up microorganisms capable of converting dioxins into diphenyl ether triols.

SOLUTION: This new oxidase gene originates from a microorganism, codes for amino acid sequences of formulas I, II, etc., and is used for converting heteropolycyclic aromatic hydrocarbons into benzoic acid analogues. A microorganism transformed with a plasmid containing the gene can convert dibenzo-p-dioxins into diphenyl ether triol compounds, thus enabling to remove the dioxins. The gene is obtained by extracting a DNA from a bacterium CA 10 (FERM P-16038) belonging to the genus Pseudomonas and decomposing heteropolycyclic aromatic hydrocarbons, producing a gene library from the DNA, screening the gene library with a probe, inserting the selected gene into Escherichia coli, culturing the Escherichia coli to oxidize its producing indole into indigo, selecting the highly colored colony and subsequently recovering the gene.

```

ATG GAG GTC GAG GAG GTC GAT GAT GAT ATT TCA GAT GAT GAT GAT 48
TGT AAT GAT ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      5      10      15
... GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 88
TTC ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      20      25      30
...
GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1152
TTC ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      270      275      280
...
TTC GAT GAT 1161
GAT GAT GAT
345

```

```

ATG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 58
TTC ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      5      10      15
... GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 96
TTC ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      20      25      30
...
GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 1200
TTC ATA GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT
      360      365      370
...
TTC GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 425

```

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]  
[Date of sending the examiner's decision of rejection]  
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

# (12) 公開特許公報 (A)

(11)【公開番号】特開平10-257895  
(43)【公開日】平成10年(1998)9月29日

(51)【国際特許分類第6版】

C12N 15/09 ZNA  
A62D 3/00 ZAB  
B09C 1/10 ZAB  
C02F 3/34  
C07H 21/04  
C12N 1/21  
// C12N 9/02  
(C12N 15/09 ZNA  
C12R 1:38 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:19 )  
(C12N 9/02  
C12R 1:19 )  
【F I】  
C12N 15/00 ZNA A  
A62D 3/00 ZAB  
C02F 3/34 Z  
C07H 21/04 B  
C12N 1/21  
C12N 9/02  
B09B 3/00 ZAB E

【審査請求】未請求【請求項の数】6【出願形態】FD【全頁数】15

(21)【出願番号】特願平9-84401  
(22)【出願日】平成9年(1997)3月18日

(71)【出願人】

【識別番号】000000033

【氏名又は名称】旭化成工業株式会社

【住所又は居所】大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)【発明者】

【氏名】大森 俊雄

【住所又は居所】東京都品川区八潮5-10-53-306

(72)【発明者】

【氏名】高見 和孝

【住所又は居所】静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(74)【代理人】

【弁理士】

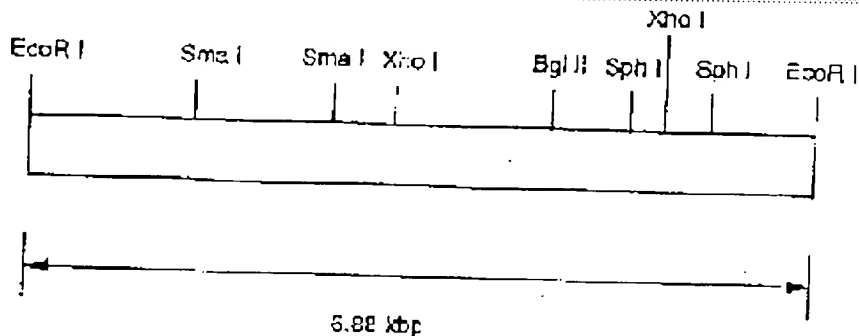
【氏名又は名称】藤野 清也

(54)【発明の名称】微生物由来の酸化酵素遺伝子及びそれを用いるダイオキシン除去方法

(57)【要約】

【課題】 遺伝子組換え微生物を用いてダイオキシンを除去する方法。

【解決手段】 配列表配列番号1~8に示される酸化酵素遺伝子及びこの遺伝子で形質転換した微生物を用いてジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体に変換する方法。遺伝子としてシェードモナス属細菌C A10株に由来するヘテロ多環芳香族炭化水素化合物酸化酵素遺伝子が用いられ、宿主細胞には、大腸菌が用いられる。ダイオキシンで汚染された土壌や水の浄化に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体へ変換する、微生物由来の酸化酵素遺伝子。

【請求項2】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列を含む請求項1記載の酸化酵素遺伝子。

文献No. B-2

【請求項3】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列を含む請求項1記載の酸化酵素遺伝子。  
【請求項4】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列を含む請求項1記載の酸化酵素遺伝子を挿入したプラスミド。  
【請求項5】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列を含む請求項1記載の酸化酵素遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換した微生物。  
【請求項6】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8のDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列を含む請求項1記載の酸化酵素遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換した微生物を用いてジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体へ変換することを特徴とするダイオキシンの除去方法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体に変換することのできる微生物由来の酸化酵素遺伝子、この遺伝子を含むプラスミド、及びこのプラスミドで形質転換した微生物に関する。さらに、本発明は、このような微生物を用いて微生物学的方法によってヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体に変換する方法に関する。本発明の方法によれば、ジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体に変換し、ダイオキシンを除去することができる。

【0002】

【従来の技術】 ポリ塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシンと称されるダイオキシンは、有害な化合物が多い。これら化合物の発生源は主に有機塩素化合物を含んだごみであって、このごみを焼却するときにダイオキシンが発生し環境中に放出され、毒性のあるこれら化合物によって環境が汚染される。現在ダイオキシンによる環境の汚染が広がっており早急な環境浄化が求められている。これらダイオキシンの除去方法に関しては、熱分解方法（特開平6-296710号公報）、燃焼条件の改善（特開平3-178389号公報）、 $\gamma$ 線照射による分解等が検討されている。しかしいずれの方法も環境中に放出され蓄積されたダイオキシンを浄化するには十分実用的な解決策を得るにいたっていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、このような有害なダイオキシンを微生物学的方法によって無害な化合物に変換する方法について長年にわたり検討を重ねた。特に、本発明者らは、ヘテロ多環芳香族炭化水素をジオール体へ変換し更に分解代謝する微生物が、構造の似ているダイオキシンの主骨格物質であるジベンゾ-p-ダイオキシンを同様に変換すると推測し、自然界より分離したカルバゾールを分解する微生物を単離し、この微生物の持つ新規な遺伝子を解明し、この遺伝子で形質転換した微生物を用いてジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体に変換する方法を開発すべく検討を行った。

【0004】 従って、本発明の課題は、微生物学的方法によってダイオキシン等を無害化する方法を提供することにある。さらに、本発明の課題は、このような方法に用いられる微生物由来の酸化酵素遺伝子、該遺伝子を挿入したプラスミド、及びこのプラスミドで形質転換した微生物を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、自然界より単離されたヘテロ多環芳香族炭化水素化合物であるカルバゾールを唯一の炭素源及び窒素源として生育できる微生物、シュードモナス属細菌CA10よりジオキシゲナーゼ遺伝子を単離し、そのDNA配列の詳細な構造を決定することに成功し、この遺伝子で形質転換した微生物を用いるとジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体へ変換することができることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、ヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体に変換する微生物由来の遺伝子に関する。

【0006】 このような遺伝子は、配列表配列番号1～8で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列あるいはこれと実質的に同じ機能のDNA配列、特にそこに示されるDNA配列を含むものである。また、本発明は、このような遺伝子を挿入したプラスミド及びこのプラスミドで形質転換された微生物に関する。さらに、本発明は、このような形質転換微生物を用いてダイオキシンの主骨格物質のジベンゾ-p-ダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体に変換する方法に関する。本発明において実質的に同じ機能のDNA配列は、その配列のDNAをわずかに変えても発現する酵素が同様にヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体に変換することのできる作用をもつDNA配列をいう。

【0007】

【発明の実施の形態】 配列表配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示される遺伝子は以下のようにして調製できる。自然界より分離されたヘテロ多環芳香族炭化水素化合物であるカルバゾールを唯一の炭素源及び窒素源として生育できる微生物シュードモナス属細菌CA10を培養し、常法（“Molecular Cloning”, J. Sambrook等、CSH, 1989など）に従ってこの菌体の全DNAを調製する。調製した全DNAを制限酵素で切断したものと、切断したDNA断片と連結可能な制限酵素切断末端を生じる制限酵素で切断したベクターとをT4 DNAリガーゼにより連結し、遺伝子ライブラリーを作製する。作製した遺伝子ライブラリーの連結物によって大腸菌宿主を形質転換する。このベクターとしては、例えばpUC118、pUC119等の汎用の大腸菌のベクターを用いることができる。大腸菌の形質転換法は常法に従えばよいが、なるべく遺伝子導入効率の高い形質転換法、例えば、Hanahan, D. J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983) に準じて行うことが好ましい。得られた形質転換菌からLB寒天培地上でインジゴを蓄積し青緑色を呈する株を選抜する。この呈色反応は、挿入DNA断片中のヘテロ多環芳香族炭化水素酸化酵素が宿主の大腸菌がLB培地上で生成するインドールを酸化して生じたインジゴの蓄積によるものであると考えられる。すなわち、呈色した菌体は、遺伝子源であるCA10株由来の酸化酵素遺伝子をコードするDNA断片を挿入したプラスミドを持つものであると断定できる。さらに青緑色を呈する菌体を各々釣菌、培養し、任意のバッファーにより菌体懸濁液を調製し、基質としてヘテロ多環芳香族炭化水素、例えばカルバゾールを加えて反応させ、基質が減少するような形質転換株を選抜する。こうしてCA10株由来のヘテロ多環芳香族酸化酵素を含む遺伝子断片を挿入したプラスミドで形質転換された株が単離される。この形質転換株を常法に従い調製し、挿入断片のDNA塩基配列をデオキシ法等によって解析する。この断片中には、目的の酸化酵素を構成する蛋白をコードする配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるDNAが図2に示される配列の向き、及び配置順で見いだされる。この形質転換細胞は、任意のヘテロ多環芳香族炭化水素を安息香酸類似体に変換する。なお、シュードモナス属細菌CA10は、*Pseudomonas* sp. CA10として、平成9年1月17日に工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-16038 として寄託されている。

【0008】 また、本発明は、ダイオキシンの主骨格物質であるジベンゾ-p-ダイオキシンを基質として、前記酸化酵素遺伝子により形質転換された微生物を用いてジフェニルエーテルトリオール体へ変換する方法に関するものである。すなわち、少なくとも上記配列1、2、3、4、5、6、7及び8で示されるアミノ酸配列をコ

ードするDNA配列を含むDNA領域あるいは上記配列番号1、2、3、4、5、6、7及び8で示される配列と同一性を有するアミノ酸配列をコードするDNA領域をプラスミド等のベクターに挿入し、このベクターで任意の宿主微生物を形質転換することにより宿主微生物にヘテロ多環芳香族炭化水素酸化活性を寄与するものである。この宿主微生物は、ジベンゾ-p-ダイオキシンからジフェニルエーテルトリオール体へ変換させるための触媒として使用することができる。また本酵素の基質特異性は広く、カルバゾール、ジベンゾフラン、キサンテン、ジベンゾチオフェン、アクリジン、フルオレン、アセナフテン、アセナフチレン、フェノキサジン、フェノチアジン、アントラセン、フェナントレン、ナフタレン、フルオランテン、ピレン、コロネン等を酸化分解する。このようにして調製された形質転換体による反応によれば、常温常圧下で有害な酸化剤を添加すること無くダイオキシンをジフェニルエーテルトリオール体に変換できる利点がある。また、芳香族炭化水素ジオール体を代謝できる微生物と組み合わせることによってジフェニルエーテルトリオール体を代謝分解でき、ダイオキシンによって汚染された汚染土壌や、汚染水を浄化することが可能である。

【0009】以下に上記DNA配列、及び上記アミノ酸配列及びこれらと同等のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子の調製、並びに該遺伝子により形質転換した微生物細胞を使用するジベンゾ-p-ダイオキシンからジフェニルエーテルトリオール体への変換に関する実施例を示すが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0010】

【実施例1】ヘテロ多環芳香族炭化水素分解菌シュードモナス属細菌CA10 (FERM P-16038)を、炭素源及び窒素源としてカルバゾール 0.1%を含む下記組成の無機培地 100mlに接種し、30℃で120rpmで攪拌下に24時間培養し、菌体を遠心回収した。無機培地：Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.8 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10 mg 蒸留水 全量で1000mlとする (pH7.0)

【0011】この菌体の全DNAを常法 ("Molecular Cloning", J. Sambrook 等, CSH, 1989 など)に従い調製した。調製した全DNAの約1μgを制限酵素EcoRIにて37℃、30分間、部分分解し、その一部を別に調製したプラスミドpUC119 1μgを同酵素にて切断したベクター溶液と混合し、T4リガーゼを加えて16℃、12時間反応させCA10由来の各種DNA断片を挿入した遺伝子ライブラリーを作製した。この遺伝子ライブラリーで常法 (Hanahan, D.J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983))により大腸菌JM109を形質転換し、その菌懸濁液 0.1mlを、アンピシリンを100mg/lの濃度で含むLB寒天培地に塗布した。この寒天培地を37℃、24時間静置し、生じた約10,000個のコロニーのうち青緑色のものが3個認められた。このコロニーの呈色は、挿入DNA断片中のヘテロ多環芳香族炭化水素酸化酵素が宿主の大腸菌がLB培地上で生成するインドールを酸化して生じたインジゴの蓄積に由来するものであると考えられる。すなわち、呈色した菌体は、遺伝子源であるCA10株由来の酸化酵素遺伝子をコードするDNA断片を挿入するプラスミドで形質転換されたものであると推定された。1にこの酸化酵素をコードするDNA断片の制限酵素図を示す。

【0012】

【実施例2】実施例1に従い取得された上記配列1、2、3、4、5、6、7及び8で示される配列を含むDNAをプラスミドpUC119に挿入した。このDNAが挿入された図2に示すプラスミドpUCA1で常法を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換体をアンピシリン50mg/lを含む2×YT培地 (バクトトリプトン16g、イーストエキス10g、食塩5g、蒸留水1リットル) 100mlで37℃にて培養した。抗生物質はアンピシリンを50mg/lの濃度で培地に添加した。600nmでの吸光度が0.3~0.5に達した時点でイソプロピル-β-D-チオガラクトピレノシド (IPTG)を終濃度で25ng/ml添加し、600nmでの吸光度が1.0~2.0に達した時点で4000×gの遠心分離により集菌し、100mlの50mMリン酸バッファーに懸濁し、再度同様に遠心に回収することによって培地成分を除去した。この菌体を同バッファー5mlに懸濁し、カルバゾールを0.1%添加し、30℃で300rpmで攪拌下に18時間振とう培養した。培養後菌体上清を塩酸で酸性にし、5ml酢酸エチルにて抽出し、シリカゲルカラムを用いて精製し、この5μlにジアゾメタンエーテル溶液50μlを加えて生成物のメチル化を行い、この3μlをガスクロマトグラフィー質量分析機を用いて下記の条件で分析したところアントラニル酸メチルエステルの生成が確認された。この結果を図3及び図4に示した。図3はカルバゾールがアントラニル酸へ変換される工程で生じた生成物のガスクロマトグラフィーである。それによるとアントラニル酸メチルエステルの生成が確認されている。また、この物質がアントラニル酸メチルエステルであることは図4の質量分析結果からみても明らかである。この結果よりカルバゾールがアントラニル酸へ変換されることが確認できた。カラム：DB-5カラム長 15m カラム直径 0.25mm ガスクロマトグラフィー質量分析機：JMS AM150 (JOEL社製) 試料導入温度：250℃ カラム温度昇温条件：60℃×2分、4℃/分×3分、16℃/分×13分 なお、前記のプラスミドpUCA1で大腸菌JM109を形質転換した形質転換体は、Escherichia coli JM109-pUCA1として平成9年2月2日に工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-16090として寄託されている。

【0013】

【実施例3】実施例1に従い取得された上記配列1、2、3、4、5、6、7、8で示される配列を含むDNAを制限酵素、EcoRI、SmaI、BglII、SphIを用いて切断し、この切断されたDNA断片をプラスミドpUC119に挿入し、上記配列の各種断片を含むプラスミドを構築し、常法を用いて大腸菌JM109株を形質転換した(図5)。図5に示した上記配列の各断片を含む形質転換体を実施例2に従って培養を行ない、培養後菌体上清を実施例2に従ってガスクロマトグラフィー質量分析機を用いてアントラニル酸メチルエステル生成の有無を確認した。それによると上記配列1、2、3、4、5、6、7、8、又は上記配列2、3、4、5、6、7、8で示される配列を含むDNAを含む形質転換体がカルバゾールをアントラニル酸へ変換することが確認された。しかし、上記配列1、2、3、4、5、6、7、8で示される配列を含むDNAを含む形質転換体のインジゴ生成によるコロニーの呈色が、上記配列2、3、4、5、6、7、8で示される配列を含むDNAを含む形質転換体のインジゴ生成によるコロニーの呈色より濃いことより、カルバゾールをアントラニル酸へ変換するには少なくとも上記配列1、2、3、4、5、6、7、8で示される配列を含むDNAが必要であることが確認できた。

【0014】

【実施例4】実施例1に従い取得された上記配列1、2、3、4、5、6、7及び8で示される配列を含むDNAを挿入したプラスミドpUCA1(図2)で常法を用いて大腸菌JM109株を形質転換(FERM P-16090)した。形質転換体をアンピシリン50mg/lを含む2×YT培地 (バクトトリプトン16g、イーストエキス10g、食塩5g、蒸留水1リットル) 100mlで37℃にて培養した。抗生物質はアンピシリンを50mg/lの濃度で培地に添加した。600nmでの吸光度が0.3~0.5に達した時点でイソプロピル-β-D-チオガラクトピレノシド (IPTG)を終濃度で25ng/ml添加し、600nmでの吸光度が1.0~2.0に達した時点で4000×gの遠心分離により集菌し、100mlの50mMリン酸バッファーに懸濁し、再度同様に遠心に回収することによって培地成分を除去した。この菌体を同バッファー5mlに懸濁し、ジベンゾ-p-ダイオキシンを0.1%添加し、30℃で300rpmで攪拌下に18時間振とう培養した。培養後菌体上清を塩酸で酸性にし、その10μlを490μl酢酸エチルにて抽出し、このうち25μlにN-メチル-N-トリメチルシリルフルオロアセトンを加え70℃、30分シリル化反応を行い、この1μlをガスクロマトグラフィー質量分析機にて下記の条件で分析したところ2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエー

テルトリメチルシリル化誘導体の生成が確認された。この結果を図6及び7に示した。図6はジベンゾー p -ダイオキシンが 2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルに変換される工程で生じた生成物のガスクロマトグラフィーである。それによると、2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルトリメチルシリル化誘導体の生成が確認されている。また、この物質が 2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルトリメチルシリル化誘導体であることは図6により確認されている。この結果よりジベンゾー p -ダイオキシンが 2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルに変換されることが確認できた。カラム: DB-5 (カラム長 15m, カラム直径 0.25mm) ガスクロマトグラフィー質量分析機: JMS AM150 (JOEL 社製) 試料導入温度: 250°C カラム温度昇温条件: 80 °C x 2分、16°C/分 x 13分

【0015】

【発明の効果】本発明によると、酸化酵素遺伝子で形質転換した微生物を用いて有毒なダイオキシンの主骨格物質のジベンゾー p -ダイオキシンを常温常圧下で対応するジフェニルエーテルトリオール体に変換することができる。従って、従来のようなダイオキシンの無害化に加熱処理する必要がなく、また有害な酸化剤を使用せず、環境に対して安全にダイオキシンを無害化することができる。この結果ダイオキシンによって汚染された汚染土壌や汚染水の浄化を可能にする。

【0016】

【配列表】 配列番号: 1 配列の長さ: 1161 配列の型: 核酸 鎖の数: 二本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA 起源 生物名: シュードモナス属細菌 配列 ATG GAC GTG GCG AAC GTT GAT GAG GCA ATT TTA AAA AGA GTA AAA GGC 48 Met Asp Val Ala Asn Val Asp Glu Ala Ile Leu Lys Arg Val Lys Gly 1 5 10 15 TGG GCG CCC TAC GTG GAT GCG AAG CTA GGC TTT CGC AAT CAT TGG TAC 96 Trp Ala Pro Tyr Val Asp Ala Lys Leu Gly Phe Arg Asn His Trp Tyr 20 25 30 CCG GTG ATG TTT TCG AAA GAG ATC GAC GAG GCG CCG AAG ACA CTA 144 Pro Val Met Phe Ser Lys Glu Ile Asp Glu Gly Glu Pro Lys Thr Leu 35 40 45 AAA CTG CTC GGT GAG AAC TTG CTC GTC AAT CGT ATC GAT GGG AAG CTG 192 Lys Leu Leu Gly Glu Asn Leu Leu Val Asn Arg Ile Asp Gly Lys Leu 50 55 60 TAT TGC CTC AAG GAC GCG TGC CTG CAT CGC GGC GTC CAG TTG TCG GTC 240 Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Cys Leu His Arg Gly Val Gln Leu Ser Val 65 70 75 80 AAA GTC GAG TGC AAA ACG AAG TCG ACG ATC ACA TGC TGG TAC CAC GCG 288 Lys Val Glu Cys Lys Thr Lys Ser Thr Ile Thr Cys Trp Tyr His Ala 85 90 95 TGG ACC TAT CGC TGG GAA GAC GGC GTT CTG TGC GAC ATC TTG ACG AAT 336 Trp Thr Tyr Arg Trp Glu Asp Gly Val Leu Cys Asp Ile Leu Thr Asn 100 105 110 CCG ACA AGC GCA CAG ATC GGT CGA CAA AAG CTG AAA ACT TAC CCA GTG 384 Pro Thr Ser Ala Gln Ile Gly Arg Gln Lys Leu Lys Thr Tyr Pro Val 115 120 125 CAG GAA GCC AAG GGC TGC TTC ATT TAT CTT GGC GAT GGC GAC CCT 432 Gln Glu Ala Lys Gly Cys Val Phe Ile Tyr Leu Gly Asp Gly Asp Pro 130 135 140 CCT CCC TTG GCC CGC GAT ACG CCA CCC AAT TTC CTT GAC GAT GAC ATG 480 Pro Pro Leu Ala Arg Asp Thr Pro Pro Asn Phe Leu Asp Asp Asp Met 145 150 155 160 GAA ATC CTC GGG AAG AAC CAA ATC ATC AAG TCT AAC TGG CGC CTC GCT 528 Glu Ile Leu Gly Lys Asn Gln Ile Ile Lys Ser Asn Trp Arg Leu Ala 165 170 175 GTG GAA AAC GGT TTC GAT CCG AGC CAC ATT TAT ATT CAC AAA GAC TCA 576 Val Glu Asn Gly Phe Asp Pro Ser His Ile Tyr Ile His Lys Asp Ser 180 185 190 ATT CTG GTC AAG GAC AAC GAT CTT GCC TTG CCA CTA GGT TTC CGC CCA 624 Ile Leu Val Lys Asp Asn Asp Leu Ala Leu Pro Leu Gly Phe Ala Pro 195 200 205 GGA GGC GAT CGA AAG CAA ACT CGT GTG GTT GAC GAT GAC GTC GTC 672 Gly Gly Asp Arg Lys Gln Gln Thr Arg Val Val Asp Asp Val 210 215 220 GGA CGC AAG GGT GTT TAC GAT CTT ATT GGC GAA CAT GGG GTC CCA GTG 720 Gly Arg Lys Gly Val Tyr Asp Leu Ile Gly Glu His Gly Val Pro Val 225 230 235 240 TTC GAG GGA ACT ATC GGG GGC GAA GTG GTC CGC GAA GGT GCC TAC GGC 768 Phe Glu Gly Thr Ile Gly Gly Glu Val Val Arg Glu Gly Ala Tyr Gly 245 250 255 GAA AAA ATT GTA GCG AAC GAT ATC TCC ATT TGG CTC CCG GGT GTT CTC 816 Glu Lys Ile Val Ala Asn Asp Ile Ser Ile Trp Leu Pro Gly Val Leu 260 265 270 AAG GTC AAT CCG TTC CCC AAT CCG GAC ATG ATG CAG TAC TGG TAC 864 Lys Val Asn Pro Phe Pro Asn Pro Asp Met Met Gln Phe Glu Trp Tyr 275 280 285 GTG CCG ATT GAC GAA AAC ACA CAC TAT TAC TTC CAA ACT CTT GGC AAA 912 Val Pro Ile Asp Glu Asn Thr His Tyr Tyr Phe Gln Thr Leu Gly Lys 290 295 300 CCA TGT GCC AAT GAC GAG GAA CCG AAG AAT TAC GAA CAA GAG TTC GAA 960 Pro Cys Ala Asn Asp Glu Glu Arg Lys Asn Tyr Glu Gln Glu Phe Glu 305 310 315 320 AGC AAG TGG AAA CCG ATG GCG CTC GAA GGA TTC AAC AAC GAT GAC ATC 1008 Ser Lys Trp Lys Pro Met Ala Leu Glu Gly Phe Asn Asn Asp Ile 325 330 335 TGG GCT CGC GAA GCT ATG GTG GAT TTC TAC GCC GAT GAT AAA GGC TGG 1056 Trp Ala Arg Glu Ala Met Val Asp Phe Tyr Ala Asp Asp Lys Gly Trp 340 345 350 GTC AAC GAG ATT TTG TTC GAG GTG GAC GAG GCT ATC GTG GCA TGG CGC 1104 Val Asn Glu Ile Leu Phe Glu Val Asp Glu Ala Ile Val Ala Trp Arg 355 360 365 AAG CTG GCG AGC GAA CAC AAT CAG GGT ATT CAG ACC CAA GCG CAC GTT 1152 Lys Leu Ala Ser Glu His Asn Gln Gly Ile Gln Thr Gln Ala His Val 370 375 380 TCG GGC TGA 1161 Ser Gly \*\*\* 385

【0017】 配列番号: 2 配列の長さ: 1218 配列の型: 核酸 鎖の数: 二本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: Genomic DNA 起源 生物名: シュードモナス属細菌 配列 ATG GGC CAA GAT CCC AAG GCA CGA GTT TAT GTA GGC AGC GAT TCA ATG 48 Met Gly Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Tyr Val Gly Ser Asp Ser Met 1 5 10 15 AAA AAG GAG ATG GAC GTG GCG AAC GTT GAT GAG GCA ATT TTA AAA AGA 96 Lys Lys Glu Met Asp Val Ala Asn Val Asp Glu Ala Ile Leu Lys Arg 20 25 30 GTA AAA GGC TGG GCG CCC TAC GTG GAT GCG AAG CTA GGC TTT CGC AAT 144 Val Lys Gly Trp Ala Pro Tyr Val Asp Ala Lys Leu Gly Phe Arg Asn 35 40 45 CAT TGG TAC CCG GTG ATG TTT TCG AAA GAG ATC GAC GAG GGC GAG CCG 192 His Trp Tyr Pro Val Met Phe Ser Lys Glu Ile Asp Glu Gly Glu Pro 50 55 60 AAG ACA CTA AAA CTG CTC GGT GAG AAC TTG CTC GTC AAT CGT ATC GAT 240 Lys Thr Leu Lys Leu Leu Gly Glu Asn Leu Leu Val Asn Arg Ile Asp 65 70 75 80 GGG AAG CTG TAT TGC CTC AAG GAC GCG TGC CTG CAT CGC GGC GTC CAG 288 Gly Lys Leu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Cys Leu His Arg Gly Val Gln 85 90 95 TTG TCG GTC AAA GTC GAG TGC AAA ACG AAG TCG ACG ATC ACA TGC TGG 336 Leu Ser Val Lys Val Glu Cys Lys Thr Lys Ser Thr Ile Thr Cys Trp 100 105 110 TAC CAC GCG TGG ACC TAT CCG TGG GAA GAC GGC GTT CTG TGC GAC ATC 384 Tyr His Ala Trp Thr Tyr Arg Trp Glu Asp Gly Val Leu Cys Asp Ile 115 120 125 TTG ACG AAT CCG ACA AGC GCA CAG ATC GGT CGA CAA AAG CTG AAA ACT 432 Leu Thr Asn Pro Thr Ser Ala Gln Ile Gly Arg Gln Lys Leu Lys Thr 130 135 140 TAC CCA GTG CAG GAA GCC AAG GGC TGC GTC TTC ATT TAT CTT GGC GAT 480 Tyr Pro Val Gln Glu Ala Lys Gly Cys Val Phe Ile Tyr Leu Gly Asp 145 150 155 160 GGC GAC CCT CCT CCC TTG GCC CGC GAT ACG CCA CCC AAT TTC CTT GAC 528 Gly Asp Pro Pro Leu Ala Arg Asp Thr Pro Asn Phe Leu Asp 165 170 175 GAT GAC ATG GAA ATC CTC GGG AAG AAC CAA ATC ATC AAG TCT AAC TGG 576 Asp Asp Met Glu Ile Leu Gly Lys Asn Gln Ile Ile Lys Ser Asn Trp 180 185 190 CGC CTC GCT GTG GAA AAC GGT TTC GAT CCG AGC CAC ATT TAT ATT CAC 624 Arg Leu Ala Val Glu Asn Gly Phe Asp Pro Ser His Ile Tyr Ile His 195 200 205 AAA GAC TCA ATT CTG GTC AAG GAC AAC GAT CTT GCC TTG CCA CTA GGT 672 Lys Asp Ser Ile Leu Val Lys Asp Asn Asp



Leu Ala Leu Pro Leu Gly 210 215 220 TTC GCG CCA GGA GGG GAT CGA AAG CAA CAA ACT CGT GTG GTT GAC  
 GAT 720 Phe Ala Pro Gly Gly Asp Arg Lys Gln Gln Thr Arg Val Val Asp Asp 225 230 235 240 GAC GTC  
 GTC GGA CGC AAG GGT GTT TAC GAT CTT ATT GGC GAA CAT GGG 768 Asp Val Val Gly Arg Lys Gly Val Tyr  
 Asp Leu Ile Gly Glu His Gly 245 250 255 GTC CCA GTG TTT GAG GGA ACT ATC GGG GGC GAA GTG GTC CGC  
 GAA GGT 816 Val Pro Val Phe Glu Gly Thr Ile Gly Gly Glu Val Val Arg Glu Gly 260 265 270 GCC TAC  
 GGC GAA AAA ATT GTA GCG AAC GAT ATC TCC ATT TGG CTC CCG 864 Ala Tyr Gly Glu Lys Ile Val Ala Asn  
 Asp Ile Ser Ile Trp Leu Pro 275 280 285 GGT GTT CTC AAG GTC AAT CCG TTC CCC AAT CCG GAC ATG ATG  
 CAG TTC 912 Gly Val Leu Lys Val Asn Pro Phe Pro Asn Pro Asp Met Met Gln Phe 290 295 300 GAG TGG  
 TAC GTG CCG ATT GAC GAA AAC ACA CAC TAT TAC TTC CAA ACT 960 Glu Trp Tyr Val Pro Ile Asp Glu Asn  
 Thr His Tyr Tyr Phe Gln Thr 305 310 315 320 CTT GGC AAA CCA TGT GCC AAT GAC GAG GAA CGG AAG AAT  
 TAC GAA CAA 1008 Leu Gly Lys Pro Cys Ala Asn Asp Glu Glu Arg Lys Asn Tyr Glu Gln 325 330 335 GAG  
 TTC GAA AGC AAG TGG AAA CCG ATG GCG CTC GAA GGA TTC AAC AAC 1056 Glu Phe Glu Ser Lys Trp Lys Pro  
 Met Ala Leu Glu Gly Phe Asn Asn 340 345 350 GAT GAC ATC TGG GCT CGC GAA GCT ATG GTG GAT TTC TAC  
 GCC GAT GAT 1104 Asp Asp Ile Trp Ala Arg Glu Ala Met Val Asp Phe Tyr Ala Asp Asp 355 360 365 AAA  
 GGC TGG GTC AAC GAG ATT TTG TTC GAG GTG GAC GAG GCT ATC GTG 1152 Lys Gly Trp Val Asn Glu Ile Leu  
 Phe Glu Val Asp Glu Ala Ile Val 370 375 380 GCA TGG CGC AAG CTG GCG AGC GAA CAC AAT CAG GGT ATT  
 CAG ACC CAA 1200 Ala Trp Arg Lys Leu Ala Ser Glu His Asn Gln Gly Ile Gln Thr Gln 385 390 395 400  
 Ala His Val Ser Gly \*\*\* 405

【0018】配列番号: 3 配列の長さ: 273 配列の型: 核酸 鎖の数: 二本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の  
 種類: Genomic DNA 起源 生物名: シュードモナス属細菌 配列 ATG GCT CGA TAT GAA GTC GAT CGC CTA ATT  
 CAG GAC ATG TCG AAA AAA 48 Met Ala Arg Tyr Glu Val Asp Arg Leu Ile Gln Asp Met Ser Lys Lys 1 5 10  
 15 GAA GGG CTC ATT GGG CGC GTG ATC GAC ACA CCA TCG GAT GTC TTT GAG 96 Glu Gly Leu Ile Gly Arg Val  
 Ile Asp Thr Pro Ser Asp Val Phe Glu 20 25 30 GAG TAC GGT TTA ACG CCT CCT GAA CGC ACT GCG CTG CTC  
 GAG GGT ACT 144 Glu Tyr Gly Leu Thr Pro Pro Glu Arg Thr Ala Leu Leu Glu Gly Thr 35 40 45 CCG CAA  
 GCA CTA GCT TCG ATT GGT GTG CAT CCG ATT CTG GAC ATG CAC 192 Pro Gln Ala Leu Ala Ser Ile Gly Val  
 His Pro Ile Leu Gln Met His 50 55 60 TAC TTG ATG TAC AAA AAT CCT GAA ATG GCT ACT CAC GTT TCT ATT  
 AAG 240 Tyr Leu Met Tyr Lys Asn Pro Glu Met Ala Thr His Val Ser Ile Lys 65 70 75 80 GAT TAT TCC  
 GAT ATG TTG AAA GGA GGC GCT TGA 273 Asp Tyr Ser Asp Met Leu Lys Gly Ala \*\*\* 85 90

【0019】配列番号: 4 配列の長さ: 810 配列の型: 核酸 鎖の数: 二本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の  
 種類: Genomic DNA 起源 生物名: シュードモナス属細菌 配列 ATG GGG AAG ATT GTT GCG GCC GGT GGT ACC  
 TCG CAT ATT CTC ATG TCT 48 Met Gly Lys Ile Val Ala Ala Gly Gly Thr Ser His Ile Leu Met Ser 1 5 10  
 15 CCA AAA GGA TGT GAG GAG AGC GCT GCT CGC GTG GTG AAC GGC ATT GCT 96 Pro Lys Gly Cys Glu Glu Ser  
 Ala Ala Arg Val Val Asn Gly Ile Ala 20 25 30 GAA CTC GGA CGG CGC TTG AAG GAA GCA CGT CCT GAT GTG  
 CTC GTC ATT 144 Glu Leu Gly Arg Arg Leu Lys Glu Ala Arg Pro Asp Val Leu Val Ile 35 40 45 ATC ACA  
 AGC GAT CAC ATG TTC AAT ATC AAC TTG TCC ATG CAA CCG CGT 192 Ile Thr Ser Asp His Met Phe Asn Ile  
 Asn Leu Ser Met Gln Pro Arg 50 55 60 TTC GTG GTG GGC ATT GCT GAC AGT TAT ACG CCG ATG GGT GAC ATG  
 GAC 240 Phe Val Val Gly Ile Ala Asp Ser Tyr Thr Pro Met Gly Asp Met Asp 65 70 75 80 ATT CCG CGT  
 GAT CTG GTG CCG GGA AGC GCG GAA GTT GGG CGC GCG ATT 288 Ile Pro Arg Asp Leu Val Pro Gly Ser Arg  
 Glu Val Gly Arg Ala Ile 85 90 95 GCG CTA CAG GCT GAT GAG GAC GGC TTT GAC TTA TGT CAA GCC GAG GAG  
 336 Ala Leu Gln Ala Asp Glu Asp Gly Phe Asp Leu Cys Gln Ala Glu Glu 100 105 110 TAC AGC CTT GAT  
 CAC GGC ATC ATG ATA CCA ATC CTG TTC ATG GGC ATT 384 Tyr Ser Leu Asp His Gly Ile Met Ile Pro Ile  
 Leu Phe Met Gly Met 115 120 125 AAA GAA ATT CCT GTA GTG CCT GTG ATT GTG AAC ATC AAT ACT GAT CCC  
 432 Lys Glu Ile Pro Val Val Pro Val Ile Val Asn Ile Asn Thr Asp Pro 130 135 140 ATC CCT TCA GCA  
 CGC CGA TGC GTG GCC CTT GCT GAA AGC ATC CGT CAA 480 Ile Pro Ser Ala Arg Arg Cys Val Ala Leu Ala  
 Glu Ser Ile Arg Gln 145 150 155 160 GCG ATC GAG AAA CGT ACG CCA GAT GGA TGC CGC GTT GCG GTA GTT  
 GGC 528 Ala Ile Glu Lys Arg Thr Pro Asp Gly Cys Arg Val Ala Val Val Gly 165 170 175 GCA GGC GGT  
 CTA TCG CAC TGG CTG TGC GTC CCG CAT GGA GAG GTA 576 Ala Gly Gly Leu Ser His Trp Leu Cys Val  
 Pro Arg His Gly Glu Val 180 185 190 AGC GAG AAA TTC GAC CAT ATG GTG ATG GAC GAG CTT GTC CGC GGC  
 AAC 624 Ser Glu Lys Phe Asp His Met Val Met Asp Glu Leu Val Arg Gly Asn 195 200 205 GCC GAA AAG  
 CTT GTC GCC ATG GGG AAC GAA GCC ATC ATC GAC CAG GGC 672 Ala Glu Lys Leu Val Ala Met Gly Asn Glu  
 Ala Ile Ile Asp Gln Gly 210 215 220 GGC AAT GCG GGC GTA GAA ATA CTG ACG TGG ATC ATG GCT GCG GTA  
 GCG 720 Gly Asn Ala Gly Val Glu Ile Leu Thr Trp Ile Met Ala Ala Val Ala 225 230 235 240 TCA GAG  
 GCA TCG TCA GGC GAA AAA GTA TTT TAT GAA GCA ATG ACA CAG 768 Ser Glu Ala Ser Ser Gly Glu Lys Val  
 Phe Tyr Glu Ala Met Thr Gln 245 250 255 TGG TTT ACC GGA ATC GGA GGA ATG GAA TTT CAT GTT AAA TAA  
 810 Trp Phe Thr Gly Ile Gly Gly Met Glu Phe His Val Lys \*\*\* 260 265 270

【0020】配列番号: 5 配列の長さ: 873 配列の型: 核酸 鎖の数: 二本鎖 トポロジー: 直鎖状 配列の  
 種類: Genomic DNA 起源 生物名: シュードモナス属細菌 配列 ATG TTA AAT AAA GCT GAA CAA ATC TCG GAA  
 AAG TCC GAA AGT GCG TAT 48 Met Leu Asn Lys Ala Glu Gln Ile Ser Glu Lys Ser Glu Ser Ala Tyr 1 5 10  
 15 GTC GAA CGC TTT GTT AAT GCG GGC GGT GTT GAA ACC CGC TAT CTC GAA 96 Val Glu Arg Phe Val Asn Ala  
 Gly Gly Val Glu Thr Arg Tyr Leu Glu 20 25 30 GCC GGC AAA GGG CAG CCC GTC ATC TTG ATC CAT GGA GGC  
 GGT GCG GGA 144 Ala Gly Lys Gly Gln Pro Val Ile Leu Ile His Gly Gly Ala Gly 35 40 45 GCG GAG  
 AGC GAA GGT AAT TGG AGA AAC GTC ATC CCC ATT CTT GCT CGT 192 Ala Glu Ser Glu Gly Asn Trp Arg Asn  
 Val Ile Pro Ile Leu Ala Arg 50 55 60 CAC TAT CGT GTG ATT GCT ATG GAC ATG CTT GGC TTT GGT AAG ACC  
 GCA 240 His Tyr Arg Val Ile Ala Met Asp Met Leu Gly Phe Gly Lys Thr Ala 65 70 75 80 AAG CCT GAC  
 ATC GAA TAT ACG CAG GAC CGC CGC ATT CGT CAC TTG CAC 288 Lys Pro Asp Ile Glu Tyr Thr Gln Asp Arg  
 Arg Ile Arg His Leu His 85 90 95 GAT TTT ATT AAA GCG ATG AAC TTC GAC GGC AAG GTC TCG ATT GTG GGA  
 336 Asp Phe Ile Lys Ala Met Asn Phe Asp Gly Lys Val Ser Ile Val Gly 100 105 110 AAT TCG ATG GGT  
 GGC GCA ACC GGC CTC GGT GTG TCT GTT CTT CAC TCT 384 Asn Ser Met Gly Gly Ala Thr Gly Leu Gly Val  
 Ser Val Leu His Ser 115 120 125 GAA CTC GTC AAT GCA CTG GTG CTC ATG GGA AGC GCA GGC CTC GTA GTA  
 432 Glu Leu Val Asn Ala Leu Val Leu Met Gly Ser Ala Gly Leu Val Val 130 135 140 GAA ATC CAC GAA  
 GAT CTG CGC CCC ATC ATC AAC TAC GAT TTC CAA CGT 480 Glu Ile His Glu Asp Leu Arg Pro Ile Ile Asn  
 Tyr Asp Phe Thr Arg 145 150 155 160 GAG GGT ATG GTC CAT TTG GTC AAG GCA CTT ACC AAC GAT GGA TTC  
 AAG 528 Glu Gly Met Val His Leu Val Lys Ala Leu Thr Asn Asp Gly Phe Lys 165 170 175 ATC GAC GAT  
 GCG ATG ATC AAC TCG CGC TAT ACC TAC GCG ACC GAT GAA 576 Ile Asp Asp Ala Met Ile Asn Ser Arg Tyr  
 Thr Tyr Ala Thr Asp Glu 180 185 190 GCT ACG CGC AAA GCC TAC GTA GCG ACA ATG CAG TGG ATT CGC GAA





【図4】 実施例2のアントラニル酸メチルエステルの質量分析結果を示す。

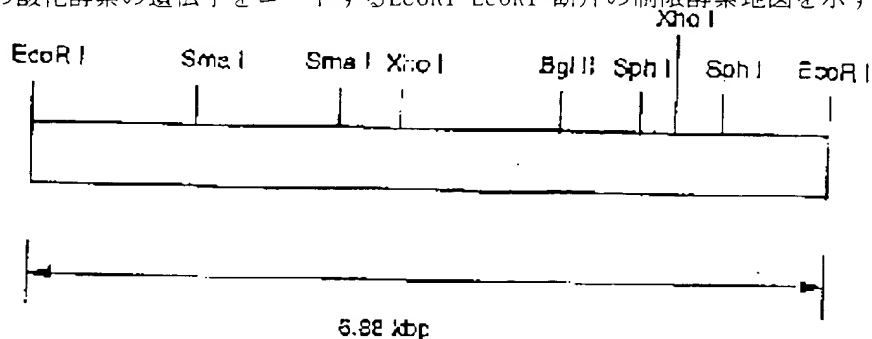
【図5】 実施例3の種々のD.N.A断片を含むプラスミドで形質転換した大腸菌 109株のカルバゾールをアントラニル酸への変換の状態を示す。

【図6】 実施例4のジベンゾ-p-ダイオキシンから 2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルへの変換工程で生成される生成物のガスクロマトグラフィーのパターンを示す。

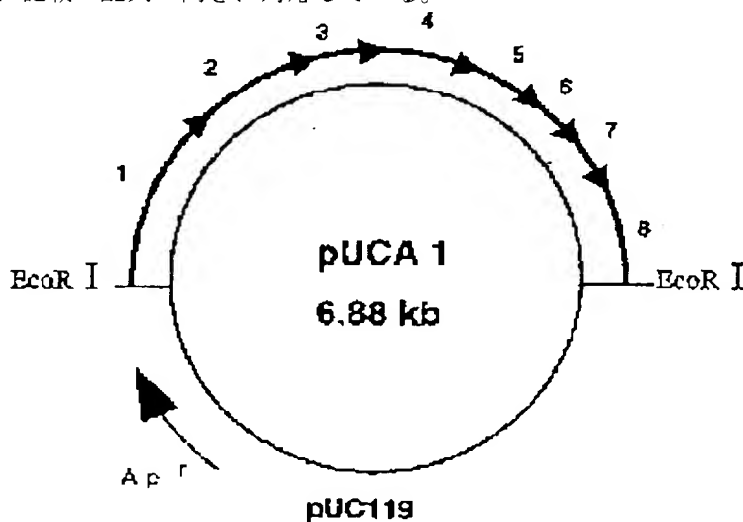
【符号の説明】 1 ジベンゾ-p-ダイオキシン II 2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルトリメチルシリル化誘導体のピーク

【図7】 実施例4の2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルトリメチルシリル化誘導体の質量分析結果を示す。

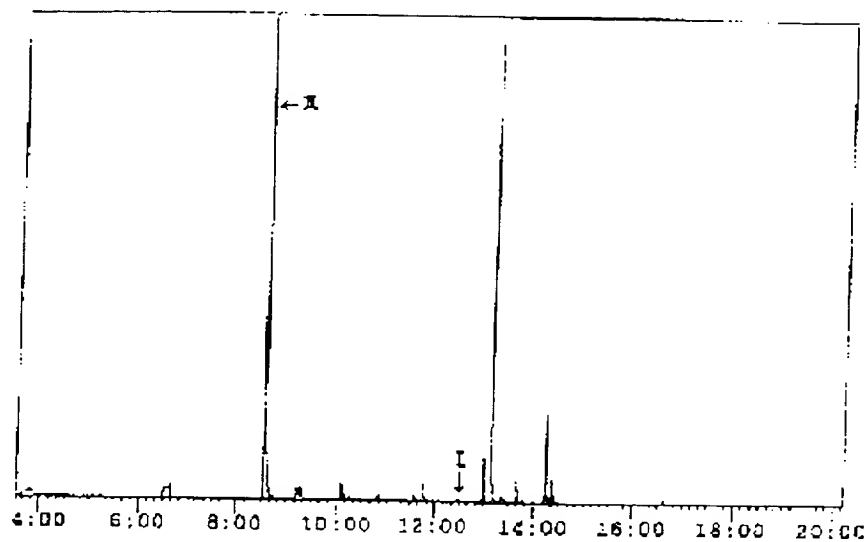
【図1】 実施例1の酸化酵素の遺伝子をコードするEcoRI-EcoRI断片の制限酵素地図を示す。



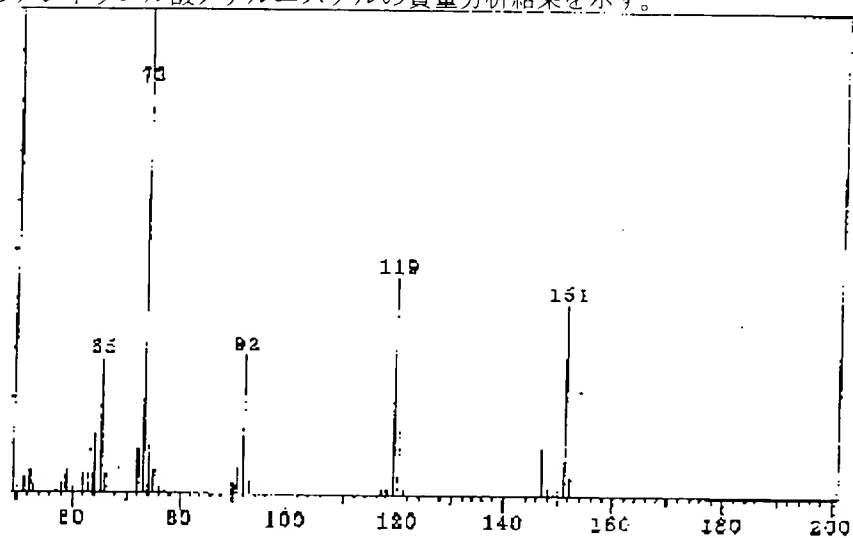
【図2】 実施例2のプラスミドpUCA1の略図を示す。数字1～8は配列表の配列番号1～8に対応し、矢印の向きは発明の詳細な説明に記載の配列の向きに対応している。



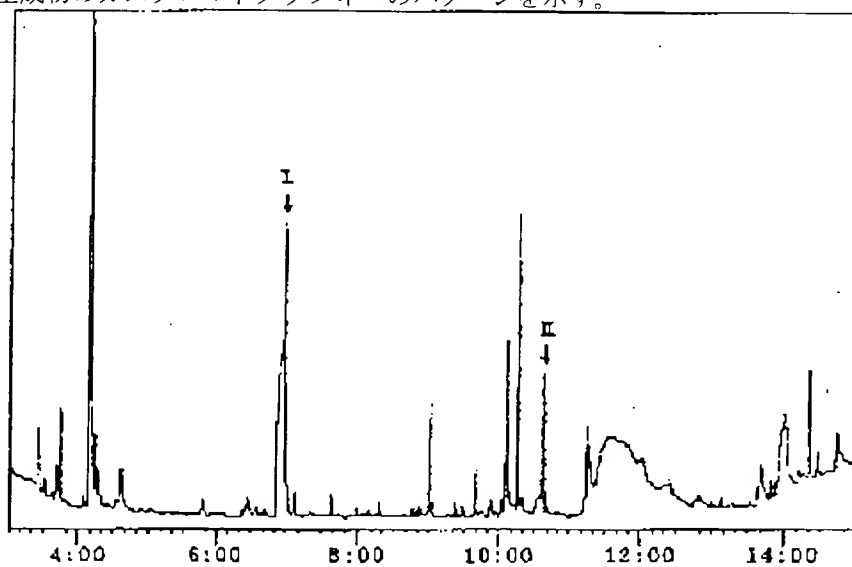
【図3】 実施例2のカルバゾールからアントラニル酸への変換工程で生成される生成物のガスクロマトグラフィーのパターンを示す。



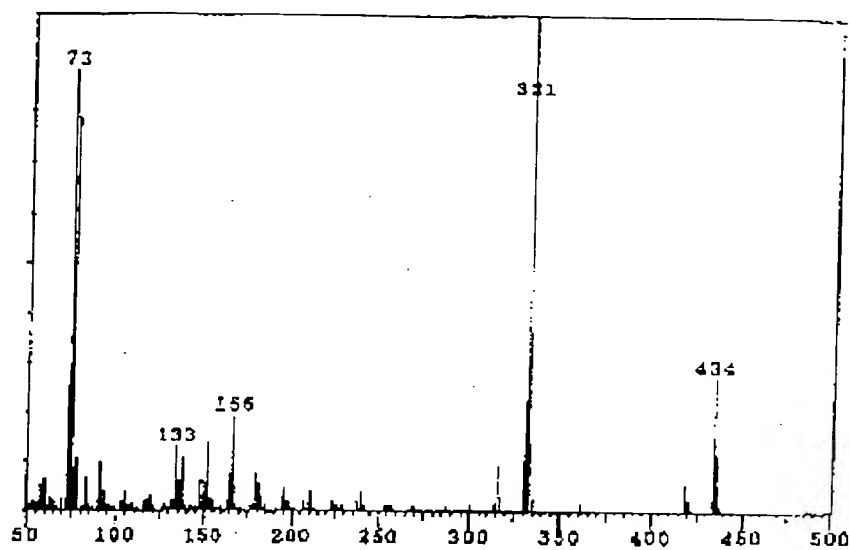
【図4】実施例2のアントラニル酸メチルエステルの質量分析結果を示す。



【図6】実施例4のジベンゾ-p-ダイオキシンから2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルへの変換工程で生成される生成物のガスクロマトグラフィーのパターンを示す。



【図7】実施例4の2, 2', 3-トリヒドロキシジフェニルエーテルトリメチルシリル化誘導体の質量分析結果を示す。



【図5】実施例3の種々のDNA断片を含むプラスミドで形質転換した大腸菌 109株のカルバゾールをアントラニル酸への変換の状態を示す。

